



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 340 131**

⑫ Número de solicitud: 200803381

⑮ Int. Cl.:
C08F 12/08 (2006.01)
C08F 8/36 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **27.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2010**

Fecha de la concesión: **04.03.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 80 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Fundación INASMET (Titular al 20 %)

⑰ Inventor/es: **Reinecke, Helmut;**
Navarro Crespo, Rodrigo y
Briz Iceta, Nerea

⑰ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑮ Título: **Preparación de superficies funcionalizadas de sustratos de poliestireno.**

⑮ Resumen:

Preparación de superficies funcionalizadas de sustratos de poliestireno.

Esta invención describe la preparación de superficies de poliestireno modificadas químicamente con una gran variedad de grupos funcionales. Se trata de una modificación en mojado que se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso se activa la superficie al crear grupos clorosulfonilos sumergiendo los sustratos de poliestireno en una disolución de ácido clorosulfónico a bajas temperaturas. Después de ser lavado, el sustrato modificado se sumerge en una disolución acuosa que contiene un compuesto bifuncional siendo uno de los grupos funcionales una amina alifática primaria que sirve de anclaje a la superficie mediante un enlace covalente de una sulfonamida. El segundo grupo funcional queda disponible en la superficie modificada y puede servir para inmovilizar biomoléculas al crear una conexión covalente, o para ajustar parámetros superficiales como la humectabilidad o adhesión.

La calidad óptica de las muestras se mantiene inalterada durante la modificación lo que permite el uso de las superficies modificadas como herramienta idónea para ensayos diagnósticos de tipo ELISA o chips ADN.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Preparación de superficies funcionalizadas de sustratos de poliestireno.

5 Sector de la técnica

Esta invención describe un método para producir de una manera simple y económica superficies de poliestireno activadas y la posterior preparación específica de superficies con una amplia variedad de grupos funcionales como grupos amina (primarias, secundarias y terciarias), grupos carboxílicos, grupos sulfónico, sulfonazidas o ésteres metílicos con una excelente calidad óptica y su aplicación en ensayos diagnósticos en los sectores biomédicos y farmacológicos.

Estado de la técnica

En las últimas décadas la comunidad científica de las áreas biológicas, clínicas y farmacéuticas han reconocido que los microensayos son herramientas muy útiles para altos rendimientos en la determinación de una variedad de interacciones y funciones biológicas y bioquímicas. Los microensayos sobre soportes u otros formatos, por ejemplo, pueden ayudar a reducir el consumo de agentes costosos o limitados, usados para la analítica biológica o bioquímica. Se acepta de forma generalizada que el formato del microensayo se mantendrá como herramienta clave en un futuro previsible. Aplicaciones para la tecnología de microensayos van a seguir expandiéndose a las áreas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, detección química, diagnóstico e investigación básica.

Por estas razones el desarrollo de un material de fase sólida que garantiza una bioactividad óptima sin pérdida de biomoléculas, es un objetivo común de científicos, laboratorios clínicos y fabricantes de kits diagnósticos. Hasta la actualidad, se han descrito en la bibliografía varios métodos para el anclaje covalente de moléculas en soportes sólidos previamente activados. Los polímeros también se han convertido en un material de soporte atractivo porque pueden ser unidos fácilmente por vía química o física con biomoléculas como enzimas, anticuerpos y fosfolípidos para formar sistemas biológicamente funcionales. Una ventaja particular al usar polímeros es que se pueden llevar a cabo los microensayos de una manera económica y en gran número lo que hace especialmente atractivo su uso en aplicaciones comerciales.

Por lo general, superficies poliméricas son hidrófobas y bastante poco reactivas. Para inmovilizar biomoléculas en superficies poliméricas sólidas a través de enlaces covalentes o iónicos hay que modificar químicamente de forma previa la superficie introduciendo grupos reactivos. La selección de la fase sólida polimérica es frecuentemente influenciada por la disponibilidad de una instrumentación compatible y sistemas de automatización. El poliestireno es uno de los materiales poliméricos de mayor uso en el sector biomédico porque tiene una claridad óptica excelente, es fácilmente moldeable y relativamente económico. Placas de poliestireno y placas multi-pocillo tienen una aceptación cada vez mayor, en parte porque los procesos de pipetear, lavar y detectar la señal son fáciles de automatizar. Otras ventajas incluyen la posibilidad de analizar múltiples muestras simultáneamente y la compatibilidad con un gran número de sistemas de detección diferentes (por ejemplo por calorimetría, fluorescencia y quimioluminiscencia). Ya en los años setenta se usaban microplacas de este polímero como recipientes de reacción para ensayos ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) que requieren superficies capaces de inmovilizar proteínas y otras biomoléculas.

Sin embargo, el Poliestireno también tiene un gran inconveniente: es un polímero muy hidrófobo y con una baja humectabilidad y el anclaje de células y otras muchas biomoléculas resulta difícil. Afortunadamente la superficie del poliestireno puede ser fácilmente modificada. Por diferentes métodos de tratamientos químicos y físicos es posible anclar una gran variedad de grupos químicos como hidroxilo, cetona, aldehído, carboxi y grupos amina al polímero que permiten el anclaje covalente de diferentes grupos reactivos para la posterior inmovilización covalente de biomoléculas. Tratamientos típicos de la superficie del poliestireno emplean descargas corona y deposición de vapores químicos así como la ozonación en fase gas y en presencia de irradiación con luz UV. Estos métodos se han empleado extensamente para mejorar la humectabilidad y las propiedades de adhesión de superficies poliméricas. Otro método convencional para modificar superficies de poliestireno con grupos amina es la polimerización por plasma de alilamina o tratamientos por plasma en presencia de N₂ o NH₃. Las superficies de PS modificadas de esta manera se emplean con entrecruzantes bifuncionales (por ejemplo glutaraldehído, carbodiimida) para acoplar biomoléculas covalentemente y conseguir así su inmovilización.

Empleando una tecnología para la modificación fotoquímica [Producing low binding hydrophobic surfaces by treating with a low HLB number non-ionic surfactant. Bookbinder Dana Craig [US]; Fewkes Jr. Edgar John [US]; Griffin James Arthur [US]; Smith Francis M [US]; Tennent David, Patent number: US6093559], el Grupo Corning fue capaz de preactivar placas multipocillos de poliestireno para la inmovilización específica y covalente de biomoléculas. Este anclaje de grupos reactivos produce las siguientes superficies estables:

- la superficie con grupos N-oxisuccinimida (NOS) que es capaz de reaccionar con grupos amina,
- la superficie con grupos maleimidas para el acoplamiento covalente de biomoléculas portadoras de grupos SH,
- la superficie con grupos hidrazidas que es reactiva hacia carbohidratos activados con periodatos,
- superficies aminadas para el anclaje covalente de biomoléculas portadores de grupos COOH.

J.D. Page *et. al.* [J.D. Page, R. Durango, A.E. Huang, Chemical modification of PS surface and its effect on immobilized antibodies, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* Vol.132, 193, (1998)] por otro lado desarrolló métodos de modificación química en mojado de partículas de PS con el fin de obtener partículas de copolímeros aminados y macroporosos a base de estireno y divinilbenzeno. En este trabajo se somete el PS entrecruzado en el primer paso a una nitración aromática clásica. En un segundo paso se reducen los grupos nitro empleando SnCl₂/HCl para formar grupos amina aromáticos primarios.

Otro método en mojado para la aminación de multi-pocillos fue propuesto por Zammateo [N. Zammateo, C. Girardeaux, D. Delforge, Amination of PS microwells: application to the covalent grafting of DNA Probes for Hybridization Assays. *Analytical Biochemistry* Vol 236, 85, (1996)]. En este trabajo se oxida en un primer paso el sustrato polimérico empleando permanganato potásico, creando grupos carboxílicos que reaccionan en un segundo paso con una diamina alifática, creando una superficie aminada. La cantidad de grupos amina formados era del orden de magnitud de picomoles/cm².

La presente invención tiene varias ventajas en comparación con los procedimientos arriba descritos para la preparación de sustratos funcionalizados a base de PS. Por un lado permite obtener superficies homogéneas con un número controlable de grupos funcionales que es de entre uno y dos ordenes de magnitud mayor que el que se consigue convencionalmente por tratamientos con plasma o UV. Por otro lado, las superficies obtenidas tienen una calidad óptica excelente con un alto grado de transparencia. Por último, el tratamiento químico en mojado en dos pasos descrito en esta patente produce selectivamente y reproduciblemente solo el grupo funcional preseleccionado.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la presente invención es el procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo que comprende las siguientes etapas:

- a) enfriamiento de una solución de ácido clorosulfónico puro en atmósfera inerte a baja temperatura.
- b) introducción en la solución a) de un sustrato de poliestireno entre 0 y 3 horas, preferiblemente 30 minutos
- c) extracción del sustrato y posterior lavado en un baño de ácido concentrado durante un tiempo entre 0 y 10 min.
- d) lavado del sustrato modificado en un baño de agua/hielo entre 0 y 5 min. preferiblemente 30 segundos y posterior secado.

Un aspecto preferente de la presente invención es que con el procedimiento de obtención de la invención se obtiene poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos que conserva las propiedades ópticas de transparencia del poliestireno transparente de partida.

Otro aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo que reacciona con alcanos disustituídos que contengan un grupo amina alifático primario para preparar derivados de poliestireno funcionalizados a través de enlaces sulfonamidas según fórmula (III), donde R es un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende

un amino (NH₂), un Bromuro (Br), un carboxílico (COOH), un éster alquílico (COOCH₃), un grupo morfina ó un hidrógeno (H);

y x toma un valor de entre 0 y 12.

Otro aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo, en la síntesis de poliestireno funcionalizado con grupos sulfónicos según fórmula (IV).

Otro aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo, en la síntesis de poliestireno funcionalizado con grupos sulfonazidas según fórmula (V).

Otro aspecto más preferente es que los sustratos de poliestireno funcionalizados (III), (IV) y (V) obtenidos, conservan sus propiedades ópticas de transparencia.

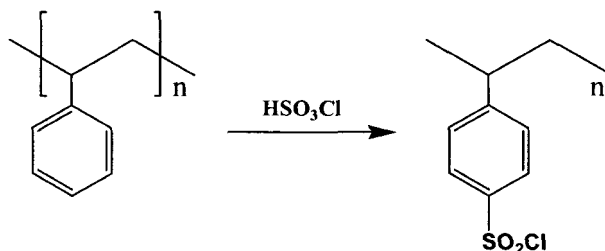
Otro aspecto de la presente invención es el uso de los sustratos de poliestirenos modificados según fórmulas (III), (IV) y (V) para el acoplamiento de biomoléculas.

Descripción detallada

El objetivo principal de la presente invención es proponer un nuevo método para fabricar sustratos sólidos a base de poliestireno con superficies de funcionalización controlada. Este objetivo se puede conseguir con una reacción en dos pasos. En el primero se modifica la superficie del sustrato con grupos clorosulfonilos y en el segundo se

hacen reaccionar estos grupos funcionales con moléculas bifuncionales que deben contener un grupo amino alifático primario (para el anclaje a la superficie preactivada en el primer paso) y un segundo grupo funcional que determinará la funcionalidad de la superficie. La longitud del espaciador entre los dos grupos funcionales determina la accesibilidad y reactividad de la funcionalidad de la superficie.

La clorosulfonación del poliestireno es una reacción bien conocida para el injerto de grupos reactivos en este polímero y ha sido descrito en diferentes trabajos empleando el PS en forma de beads entrecruzados o fibras. Sin embargo, no se describe ningún uso de la reacción en superficies transparentes. El valor particular de la presente invención es haber encontrado las condiciones experimentales que permiten la aplicación de dicha reacción a sustratos sólidos de poliestireno sin provocar degradación de la superficie ni perjudicar las propiedades ópticas, tales como su transparencia.



De esta forma, un aspecto de la presente invención es el procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo que comprende las siguientes etapas:

- enfriamiento de una solución de ácido clorosulfónico puro en atmósfera inerte a baja temperatura.
- introducción en la solución a) de un sustrato de poliestireno entre 0 y 3 horas, preferiblemente 30 minutos
- extracción del sustrato y posterior lavado en un baño de ácido concentrado durante un tiempo entre 0 y 10 min.
- lavado del sustrato modificado en un baño de agua/hielo entre 0 y 5 min. preferiblemente 30 segundos y posterior secado.

Un aspecto preferente de la presente invención es que la temperatura de la etapa a) está comprendida entre -20°C y 20°C .

Un aspecto más preferente es que la temperatura de la etapa a) es -10°C Otro aspecto preferente es que el ácido utilizado en la etapa c) es ácido sulfúrico.

Otro aspecto preferente es que la temperatura del lavado en baño ácido de la etapa c) está entre -20°C y 10°C .

Un aspecto más preferente es que la temperatura de la etapa c) es -10°C .

Otro aspecto de la presente invención es que el procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos se realiza sobre sustratos de de poliestireno introducidos en la etapa b) y que son transparentes.

Un aspecto preferente de la presente invención es que con el procedimiento de obtención de la invención se obtiene poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos que conserva las propiedades ópticas de transparencia del poliestireno transparente de partida.

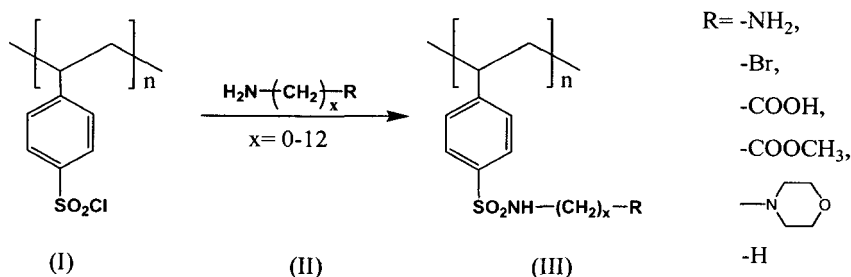
Variando los parámetros de reacción (tiempo, temperatura, pureza del ácido clorosulfónico) se pueden conseguir de manera controlable superficies con una cantidad variable de grupos clorosulfonilos que pueden ser detectados y cuantificados fácilmente por espectroscopia FTIR-ATR según se observa en la figura 1.0.

El objetivo del segundo paso de la modificación es beneficiarse de la alta reactividad de los grupos clorosulfonilos en la superficie para crear de una manera controlada nuevos grupos funcionales.

De esta forma otro aspecto de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos obtenido mediante el proceso anteriormente descrito, como intermedio en reacciones de obtención de poliestireno funcionalizado.

ES 2 340 131 B1

Un aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo que reacciona con alcanos disustituídos que contengan un grupo amina alifático primario para preparar derivados de poliestireno funcionalizados a través de enlaces sulfonamidas según fórmula (III).



20 donde R es un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende

un amino (NH₂),

25 un Bromuro (Br),

un carboxílico (COOH),

un éster alquílico (COOCH₃),

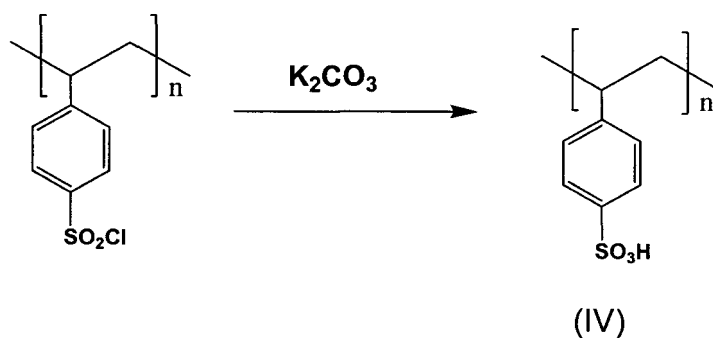
30 un grupo morfolina

ó un hidrógeno (H);

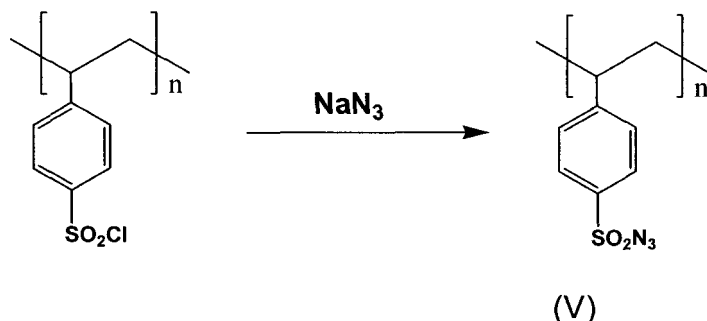
35 y x toma un valor de entre 0 y 12.

Este objetivo se consigue sumergiendo los sustratos modificados de PS en disoluciones acuosas de alcanos disustituídos que contengan un grupos amino alifático primario y un segundo grupo funcional a elegir R. Los grupos amina se anclan a través de enlaces sulfonamidas a la superficie. El segundo grupo funcional de la molécula elegida queda libre y disponible para un futuro anclaje de alguna biomolécula.

Otro aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo, en la síntesis de poliestireno funcionalizado con grupos sulfónicos (IV) por reacción de hidrólisis en condiciones adecuadas



Otro aspecto preferente de la presente invención es el uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo, en la síntesis de poliestireno funcionalizado con grupos sulfonazidas (V) por reacción de la superficie activada con azida sódica.



Otro aspecto preferente es que los sustratos de poliestireno funcionalizados (III), (IV) y (V), conservan sus propiedades ópticas de transparencia. Como se trata de una modificación de la superficie polimérica y no de un recubrimiento, la superficie obtenida es consistente y estable con el tiempo.

Variando los parámetros de reacción (tiempo, temperatura, concentración de la disolución acuosa compuesto modificador, número de grupos alquilo de los alcanos disustituido) se pueden conseguir superficies con una cantidad variable de grupos funcionales. Además, en los nuevos materiales se puede ajustar la distancia entre la superficie y los grupos funcionales creados a través de la longitud del espaciador alifático empleado. Eso permite una excelente accesibilidad para las biomoléculas.

En el caso de una aminación de la superficie se consigue valores de entre 1 y 50 nmol/cm² para la cantidad de grupos funcionales que se anclan a la superficie dando este método valores que son de un orden de magnitud entre 1 y 2 mayor que la que se obtiene con métodos convencionales.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de los sustratos de poliestirenos modificados según fórmulas (III), (IV) y (V) para el acoplamiento de biomoléculas.

Un aspecto preferente de la presente invención es el uso de los sustratos de poliestireno modificado según fórmulas (III), (IV) y (V) en el que las biomoléculas acopladas pueden ser anticuerpos y enzimas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Espectro Raman de PS modificado con grupos clorosulfonilos. Eje x es el número de onda, el eje y es la absorbancia en unidades arbitrarias. Los grupos clorosulfonilos se caracterizan por dos fuerte bandas a 1373 cm⁻¹ y 1171 cm⁻¹ que corresponden a las bandas de valencia del S = O.

Ejemplos de realización

1) Preparación de un sustrato de PS modificado con grupos clorosulfonilos

Un reactor con agitación magnética se rellena con Ácido Clorosulfónico puro, pasa N₂ por la disolución y enfría el líquido a una temperatura de -10°C. Se sumerge un film rectangular de PS con las dimensiones 75 mm*25 mm*2 mm en el reactor durante por ejemplo 20 minutos. Después de la reacción se saca la muestra del reactor y se lava en un baño de ácido sulfúrico concentrado a -10°C durante 30 segundos. Finalmente se lava el film modificado en un baño de agua/hielo durante 30 segundos y se seca. La cantidad de los grupos clorosulfonilos se puede analizar cualitativamente y cuantitativamente por FTIR-ATR donde salen bandas características a 1170 y 1370 cm⁻¹. Su cuantificación se lleva a cabo mediante una curva de calibrado con muestras de PS en polvo clorosulfonados cuyo contenido de azufre se determina mediante análisis elemental.

2) Preparación de un sustrato de PS modificado con grupos aminas primarias

a) Distancia de la cadena polimérica de tres grupos alquilo

Se sumerge durante 15 minutos un film clorosulfonado en una disolución de 1,3-diaminopropane en agua a una concentración de c = 8 mol/l (20 ml diamina, 10 ml H₂O) a 40°C. Después de un lavado con agua a temperatura ambiente se seca el film.

ES 2 340 131 B1

b) Distancia de la cadena polimérica de seis grupos alquilos

Se sumerge durante 240 minutos un film clorosulfonado en una disolución de 1,6-diamino(hexane) en agua a una concentración de $c = 6 \text{ mol/l}$ (30 ml diamina, 8.4 ml H_2O) a 40°C . Después de un lavado con agua a temperatura ambiente se seca el film.

c) Distancia de la cadena polimérica de diez grupos alquilos

Se sumerge durante 240 minutos un film clorosulfonado en una disolución de, 1,10-diamino(decane) en agua a una concentración de $c = 2 \text{ mol/l}$ (7 ml diamina, 9.4 ml H_2O) a 60°C . Después de un lavado con agua a temperatura ambiente se seca el film.

d) Caracterización y cuantificación de grupos aminas

La formación de grupos aminas primarias libres en la superficie se puede comprobar cualitativamente por FTIR-ATR: se observa bandas a 3369 y 3278 cm^{-1} que corresponden al enlace N-H asociado y libre. El anclaje del reactivo a la superficie mediante la formación de un grupo sulfonamida se comprueba por el desplazamiento inequívoco de las bandas a 1170 y 1370 cm^{-1} de los grupos clorosulfonilos hacia 1156 y 1312 cm^{-1} .

Para la evaluación del número de grupos aminas libres en la superficie se realiza un estudio colorimétrico mediante Orange II [Hamerli P, Weigel Th., Groth Th., Paul D. Biomaterials 24 (2003) 3989-3999]. Este reactivo se une a aminas primarias vía una reacción ácido-base y absorbe a 485 nm .

Método

1. Se sumerge la superficie en Orange II $0.5 \mu\text{M}$ en solución acuosa pH3.
 2. Se deja en contacto toda la noche a temperatura ambiente y agitación mecánica 30 rpm/ml.
 3. Se aclara 5 veces con agua a pH3
 4. Se extrae, en agitación mecánica, con 10 ml de NaOH 0.1 M durante 30 minutos a temperatura ambiente, en tu caso utilizamos 5 h a 45°C .
- Se mide I absorbancia a 485 nm .

Ejemplos de aplicaciones

e1) Adhesión de anticuerpos

Adhesión de anticuerpos a superficies de PMMA aminadas.

Método

1. Se sumergen las superficies en una solución de glutaraldehído al 10% en agua con *N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, *N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt y trietilamina (5: 1.5: 10), durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Se aclara con agua cuatro veces.
3. Se pone estreptavidina 0.1 mg/ml en PBS 1x toda la noche a 4°C .
4. Se aclara 4 veces en PBS 1x
5. Se sumerge la superficie en una solución de BSA al 1% en agua durante 30 minutos.
6. Se aclara con agua 4 veces.
7. Se incuba 1 h a temperatura ambiente la superficie en contacto con el anticuerpo biotinilado 0.04 mg/ml en PBS 1x.
8. Se aclara con PBS 4 veces.

ES 2 340 131 B1

e2) enzyme-linked immunosorbent assay ELISA

Se han realizado ensayo ELISA en las superficies aminadas sintetizadas. Además en las superficies aminadas se han realizado tres procedimientos distintos para el anclaje del anticuerpo anti IL-6 a la superficie (Paso 1).

Métodos

1. Funcionalización de la superficie con el anticuerpo anti IL-6

A. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante:

- a. Dilución 1/250 en “coating buffer”. 48 ul de Ac en 12 ml de buffer.
- b. Echar 100 ul/pocillo
- c. Dejar toda la noche a 4°C
- d. Retirar el líquido y lavar 5 veces con tampón de lavado echando más de 250 ul/pocillo. Dejar agitando 1 minuto cada lavado.
Tampón de lavado: PBS1x + Tween 20 0.05% (Sigma P3563)
- e. Diluir 1 parte de Assay diluent en 4 partes de agua destilada y echar 200 ul/pocillo. Dejar así 1 h RT.
- f. Aspirar y lavar 5 veces como en el punto d.

B. Mediante crosslinker glutaraldeído

- a. Glutaraldeído al 10% durante 20' y aclarar 4 veces con agua.
- b. Dilución 1/250 en “coating buffer”. 48 ul de Ac en 12 ml de buffer.
- c. Echar 100 ul/pocillo
- d. Dejar toda la noche a 4°C
- e. Retirar el líquido y lavar 5 veces con tampón de lavado echando más de 250 ul/pocillo. Dejar agitando 1 minuto cada lavado.
Tampón de lavado: PBS1x + Tween 20 0.05% (Sigma P3563)
- f. Diluir 1 parte de Assay diluent en 4 partes de agua destilada y echar 200 ul/pocillo. Dejar así 1 h RT.
- g. Aspirar y lavar 5 veces como en el punto d.

C. Mediante crosslinker EDAC

- a. Dilución 1/250 en “coating buffer”. 12 ul de Ac + 0.03 ul de trietilamina + 0.12 mg de EDAC + 7.5 ug de NH-sulfo en 3 ml de buffer.
- b. Echar 100 ul/pocillo
- c. Dejar toda la noche a 4°C
- d. Retirar el líquido y lavar 5 veces con tampón de lavado echando más de 250 ul/pocillo. Dejar agitando 1 minuto cada lavado.
Tampón de lavado: PBS1x + Tween 20 0.05% (Sigma P3563)
- e. Diluir 1 parte de Assay diluent en 4 partes de agua destilada y echar 200 ul/pocillo. Dejar así 1 h RT.
- f. Aspirar y lavar 5 veces como en el punto d.

ES 2 340 131 B1

3a) Preparación de un sustrato de PS modificado con grupos carboxílicos

Se sumerge durante 60 minutos un film clorosulfonado en una disolución acuosa del metilester de la α -alanina a una concentración de $c = 6 \text{ g/40 ml}$ a 40°C . Se lava el film modificado con agua a temperatura ambiente y lo sumerge posteriormente durante 15 minutos en una disolución acuosa de KOH a 40°C . Se lava el film primero en HCl concentrado y posteriormente en agua y se seca.

El anclaje del metilester de la α -alanina a la superficie se comprueba por un lado por la formación completa de grupos sulfonamidas (ver también 2d) y por otro lado por la formación de una banda a 1737 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo de un éster. También es posible transformar la superficie con grupos carboxílicos reversiblemente en la sal correspondiente al sumergir el film en una disolución acuosa de NaOH. Al exponerlo posteriormente a una disolución ácida ($\text{pH} = 1$) se recupera completamente los grupos carboxílicos.

b) Determinación de grupos carboxílicos

Para la evaluación del grado de carboxilación obtenido con cada proceso se realiza un estudio colorimétrico mediante azul de toluidina O (TBO) [Goddard J.M., Talbert J.N., and Hotchkiss J.H. Journal of Food Science, vol 12, Nr 1, 2007]. Este reactivo se une a grupos carboxílicos y absorbe a 697 nm .

Método

1. Se sumerge la superficie en TBO 0.5 mM en solución acuosa $\text{pH } 10$.
2. Se deja en contacto toda la noche a temperatura ambiente y agitación mecánica 30 rpm/mi .
3. Se aclara 5 veces con agua a $\text{pH } 10$.
4. Se extrae, en agitación mecánica, con 10 ml de HCl 37% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se mide Absorbancia a 697 nm (el pico del TBO es a 633 nm en ácido acético 50% al tener que cambiar de medio de extracción ha cambiado el pico máximo de adsorción).

c) Aplicaciones: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Se han realizado ensayo ELISA en las superficies carboxiladas sintetizadas. Se ha seguido el procedimiento establecido por el fabricante.

1. Captura de antígeno

- g. Diluir el estándar (IL-6) 5 ul en 25 ml en Assay diluent $1x$ así sería 200 pg/ml , por tanto hacer las diluciones requeridas y echar 100 ul/pocillo . Cubrir y cerrar incubándolo toda la noche a 4°C .
- h. Aspirar y lavar como en 1.d.

2. Detección del antígeno

- a. Diluir el anticuerpo de detección (biotin anti IL-6) $1/250$, es decir, 48 ul por 12 ml de Assay diluent $1x$. Echar 100 ul/pocillo . Tapar e incubar 1 h RT.
- b. Aspirar y lavar 5 veces como en 1d.

3. Inmovilización de la enzima

- a. Diluir la enzima con avidina (avidin-HRP) $1/250$, es decir, 48 ul por 12 ml de Assay diluent $1x$. Echar 100 ul/pocillo . Tapar e incubar 30 minutos a RT.
- b. Aspirar y lavar 7 veces como en 1d, dejando 1-2 minutos en cada lavado.

4. Actividad enzimática

- a. Añadir 100 ul/pocillo del sustrato sin diluir. Incubar RT 15 minutos.
- b. Añadir 50 ul/pocillo de stop solution ($2N (1M) \text{ H}_2\text{SO}_4$).

5. Lectura y análisis de datos

- a. Medir la placa a 450 nm.

5

4) *Preparación de un sustrato de PS modificado con grupos sulfónicos:*

10 Se sumerge durante 20 minutos un film clorosulfonado en una disolución acuosa de carbonato potásico a una concentración de $c = 1 \text{ g/20 ml}$ a 50°C . Después de 2 horas la reacción está completada. Se lava el film modificado con agua a temperatura ambiente y se seca el film.

15 La formación de grupos sulfónicos se comprueba al observar la desaparición completa de la banda a 1370 cm^{-1} de los grupos clorosulfonilos y la formación de nuevas bandas características del grupo sulfónico a 1131 , 1040 y 1010 cm^{-1} . También es posible transformar la superficie con grupos sulfónicos reversiblemente en la sal correspondiente al sumergir el film en una disolución acuosa de NaOH. Al exponerlo posteriormente a una disolución ácida ($\text{pH} = 1$) se recupera completamente los grupos sulfónicos.

20 5) *Preparación de un sustrato de PS modificado con grupos sulfónazidas*

Se sumerge durante 3 horas un film clorosulfonado en una disolución acuosa de azida sódica a una concentración de $c = 10 \text{ g/20 ml}$ a 40°C . Después de 24 horas la reacción está completada. Se lava el film modificado con agua a temperatura ambiente y se seca el film.

25 La formación de grupos sulfónazidas se comprueba al observar la desaparición completa de la banda a 1370 cm^{-1} de los grupos clorosulfonilos y la formación de nuevas bandas características del grupo azida a 2133 cm^{-1} .

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo que comprende las siguientes etapas:

- a) enfriamiento de una solución de ácido clorosulfónico puro en atmósfera inerte a baja temperatura.
- b) introducción en la solución a) de un sustrato de poliestireno entre 0 y 3 horas, preferiblemente 30 minutos
- c) extracción del sustrato y posterior lavado en un baño de ácido concentrado durante un tiempo entre 0 y 10 min.
- d) lavado del sustrato modificado en un baño de agua/hielo entre 0 y 5 min. preferiblemente 30 segundos y posterior secado

y esta **caracterizado** porque:

- en la etapa a) la temperatura está entre -20°C y 20°C,
- en la etapa c) el ácido utilizado es ácido sulfúrico y
- en la etapa c) la temperatura del lavado en baño ácido es entre -20 y 10°C.

2. Procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 1 en que la temperatura de la etapa a) es de -10°C.

3. Procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 1 en que la temperatura de la etapa c) es de -10°C.

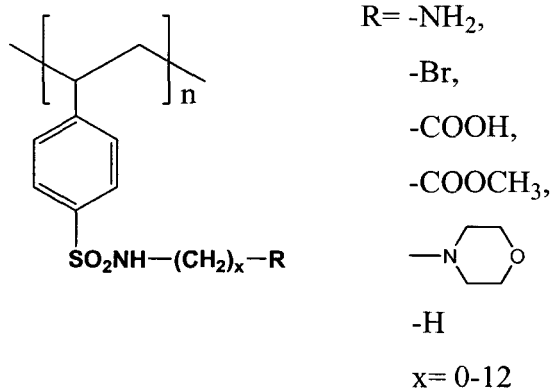
4. Procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 1 **caracterizado** porque el sustrato de poliestireno introducido en la etapa b) es transparente.

5. Poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos según reivindicación 4 **caracterizado** porque conserva las propiedades ópticas del poliestireno transparente.

6. Uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilos obtenido mediante el proceso descrito en las reivindicaciones 1 a la 5, como intermedio en reacciones de obtención de poliestireno funcionalizado.

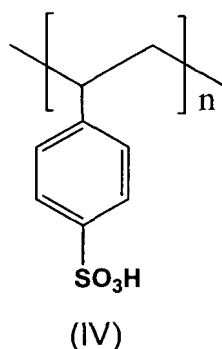
7. Uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 6 que reacciona con alcanos disustituídos que contengan un grupo amina alifático primario para la preparación de derivados de poliestireno funcionalizados a través de enlaces sulfonamidas según fórmula (III), donde

- -R es un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende un amino (NH₂), un Bromuro (Br), un carboxílico (COOH) un éster alquílico (COOCH₃), un grupo morfolina ó un hidrógeno (H);
- -x toma un valor de entre 0 y 12

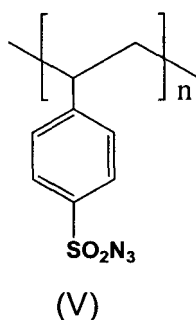


(III)

8. Uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 6 en el que el poliestireno se funcionaliza con grupos sulfónicos según fórmula (IV)



9. Uso del poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo según reivindicación 6 en el que el poliestireno se funcionaliza con grupos sulfonazidas según fórmula (V)



10. Sustratos modificados según reivindicaciones 8, 9 y 7 **caracterizados** porque los poliestirenos modificados según fórmulas (III) (IV) y (V) conservan sus propiedades ópticas de transparencia.

11. Uso de los sustratos de poliestireno modificados según fórmula (III), (IV) y (V) para el acoplamiento de biomoléculas.

12. Uso de los sustratos de poliestireno modificados según reivindicación 11 en el que las biomoléculas son anticuerpos.

13. Uso de los sustratos de poliestireno modificados según reivindicación 11 en el que las biomoléculas son enzimas.

ES 2 340 131 B1

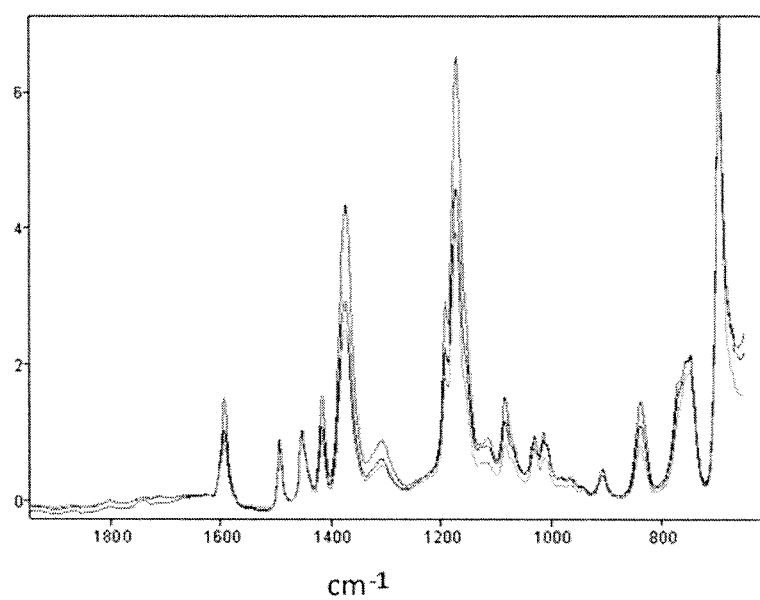


Fig 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 340 131

⑫ Nº de solicitud: 200803381

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.11.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	G. ZUNDEL et al., "Kinetics of sulfonation reactions and uniformity of sulfonate-group distribution in poly(styrenesulfonic acid)", Zeits. Phys. Chem. (Leipzig), 1969, vol. 240, nº 1-2, páginas 90-91.	1-3
X	GB 1100712 A (ENGLISH ELECTRIC CO.) 24.01.1968, página 1, líneas 36-61; página 2, líneas 58-60.	1-5
X	N. BICAK et al., "Copper patterned polystyrene panels by reducing of surface bound Cu(II)-sulfonylhydrazide complex", Surf. & Coat. Techn., 01.02.2008, vol. 202, páginas 1581-1587, ver página 1582, apartados 2.2 y 2.4, página 1583, apartado 3.	6,7,10
X	V. P. CHU et al., "Protein-reactive, molded polystyrene surfaces having applications to immunoassay formats", J. Appl. Polym. Sci., 1987, vol. 34, páginas 1917-1924.	6-8,10-12
X	US 4235973 A1 (CH-J. TSCHANG et al.) 25.11.1980, columna 3, líneas 17-52, ejemplos.	6,7,10,11
X	US 3709844 A1 (J. E. HERWEH et al.) 09.01.1973, ejemplo 1.	6-8
A	C. BOISSON et al., "Antithrombotic properties of insoluble modified polystyrene: Part I", Thromb. Res., 1984, vol. 34, páginas 269-276.	11,13
A	E. IMBERT-LAURENCEAU et al., "Surface modification of polystyrene particles for specific antibody adsorption", Polymer, 2005, vol. 46, páginas 1277-1285.	6,7,11,12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.02.2010

Examinador

E. Dávila Muro

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C08F 12/08 (2006.01)

C08F 8/36 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08F, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,PAJ,CAPLUS,MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-5,9	SÍ
	Reivindicaciones	6-8,10-13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Zeits. Phys. Chem. (Leipzig), 1969, vol. 240, nº 1-2, pgs. 90-91	1969
D02	GB 1100712 A	1968
D03	Surf. & Coat. Techn., 01.02.2008, vol. 202, pgs. 1581-1587	01-02-2008
D04	J. Appl. Polym. Sci., 1987, vol. 34, pgs. 1917-1924	1987
D05	US 4235973 A1	1980
D06	US 3709844 A1	1973

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de poliestireno modificado con grupos clorosulfonilo mediante tratamiento en etapas sucesivas de un sustrato de PS con una solución de ClSO_3H enfriada entre -20°C y $+20^\circ\text{C}$ en atmósfera inerte, extracción y lavado del sustrato en un baño de SO_4H_2 concentrado a temperatura entre -20°C y $+10^\circ\text{C}$, lavado en un baño de agua/hielo y posterior secado. La invención también se refiere al PS modificado con grupos clorosulfonilo, al uso del mismo como intermedio para obtener PS funcionalizado a través de enlaces sulfonamidas, PS sustituido con grupos sulfónicos y con grupos sulfonazidas, los sustratos de PS así modificados y su uso para el acoplamiento de biomoléculas (anticuerpos y enzimas).

El documento D01, considerado el estado de la técnica más próximo a la invención, divulga la clorosulfonación de una lámina de PS utilizando una mezcla de ClSO_3H y SO_4H_2 en un baño a 0°C de temperatura, aunque no se menciona un posterior lavado del sustrato modificado en un baño de agua/hielo.

La preparación de un sustrato de PS modificado con grupos clorosulfonilo de acuerdo con la reivindicación 1 difiere de lo conocido según el documento D01 solamente en que la etapa de lavado del sustrato de PS con un baño de agua/hielo después de la clorosulfonación ha sido omitida. Esta variante operativa se considera dentro del alcance de la práctica habitual seguida por el experto en la materia. Consecuentemente, el objeto de las reivindicaciones 1-3 se considera que carecen de actividad inventiva según el artículo 8.1 LP 11/1986.

El documento D02 describe un método de clorosulfonación de PS que consiste en introducir un molde de PS en un baño de hexano y ClSO_3H , seguido de lavado con hexano y secado (ver página 1, líneas 36-58). No se especifica la temperatura del baño, aunque sí se señala que el proceso no afecta a las propiedades ópticas del sustrato de partida, que mantiene su transparencia inicial (ver página 2, líneas 58-60).

Si bien en D02 no se divulga de manera explícita las mismas características operativas que se indican en la invención respecto al proceso de clorosulfonación del PS (no se menciona el lavado final del sustrato de PS con un baño de ácido y a continuación de agua/hielo), esta diferencia no parece afectar al resultado final en el producto obtenido, ya que en D02 se señala que este procedimiento no perjudica las propiedades ópticas del PS de partida, tal como su transparencia. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-5 se considera que carecen de actividad inventiva (artículo 8 LP).

El documento D03 divulga la modificación química de sustratos de PS para formar recubrimientos metálicos sobre superficies poliméricas. El primer paso supone la clorosulfonación de un sustrato de PS en un baño de ClSO_3H a temperatura ambiente y posterior lavado en un baño de agua/hielo (ver Apartado 2.2). A continuación se hace reaccionar con hidróxido de hidracina a temperatura ambiente, lo que permite obtener sustratos de PS funcionalizados con grupos sulfonilhidrazida (ver Apartados 2.2 y 2.4).

El documento D04 describe la funcionalización de PS con grupos clorosulfonilo para el acoplamiento de anticuerpos al soporte polimérico. Se utiliza una solución de ClSO_3H enfriado en un baño de hielo seco y acetona en atmósfera inerte para tratar PS en forma de microesferas a temperatura de 0°C - 5°C ; después se lleva a cabo un lavado con nitrometano para eliminar los restos de ClSO_3H . Los sustratos de PS con grupos clorosulfonilo se modifican a continuación con distintos grupos reactivos mediante reacción de los mismos con hidrazina, diaminas como etilendiamina, bromuro de bromoacetilo, dinitrofluorobenceno o anhídrido yodoacético, para conseguir superficies reactivas a proteínas (ver páginas 1918-1919).

Hoja adicional

El documento D05 se refiere a la preparación de una resina de PS clorosulfonada como intermedio para obtener resinas de poliestireno funcionalizado con grupos sulfónico o sulfonamida que sirven para el anclaje covalente de proteínas. En el ejemplo 1 (ver columna 6, líneas 12-30) se describe la reacción de un polímero de estireno y divinilbenceno con ClSO_3H en un baño de agua/hielo, se deja reaccionar a temperatura ambiente y el producto se lava con cloroformo y dioxano y se seca. Esta resina de poliestireno clorosulfonada se hace reaccionar con hidrazina o diaminas de tipo $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}_2$ para obtener PS con grupos sulfonamida, o bien se hidrolizan los grupos clorosulfonilo para obtener resinas de PS con grupos sulfónicos (ver columna 3, líneas 17-52).

El documento D06 divulga la preparación de PS funcionalizado con grupos sulfonilhidrazidas. Se lleva a cabo la clorosulfonación del PS en una solución de cloruro de etileno con ácido clorosulfónico a $-4^\circ-0^\circ\text{C}$ y posterior lavado en un baño de agua/hielo. El PS clorosulfonado se hace reaccionar en tetrahidrofurano a $0^\circ-5^\circ\text{C}$ con una solución acuosa de $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$ (ver columna 2, líneas 10-20,30-43).

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 6-8 y 10-13 se considera que no es nuevo y que no implica actividad inventiva, según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.

Aunque no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica anterior la utilización de sustratos de PS con grupos clorosulfonilo para obtener PS con grupos sulfonazidas como se recoge en la reivindicación 9, a la vista de lo descrito en D03-D06 ésta sería una mera variación estructural sobre todo teniendo en cuenta que se utilizan como intermedios para la funcionalización de PS con grupos sulfonilo o sulfonamida. En consecuencia el objeto de la invención recogido en la reivindicación 9 tampoco cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8.1 LP 11/1986.